

Thesis Title	Genetic Study of <i>Anopheles barbirostris</i>	
Author	Miss Atiporn Saeung	
Degree	Doctor of Philosophy (Parasitology)	
Thesis Advisory Committee		
	Prof. Dr. Wej Choochote	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Udom Chaithong	Member
	Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Member
	Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi	Member
	Assoc. Prof. Dr. Benjawan Pitasawat	Member
	Asst. Prof. Dr. Narissara Jariyapan	Member

ABSTRACT

Twenty-three isolines of *Anopheles barbirostris* derived from animal-biting females showed 3 karyotypic forms: Form A (X_1, X_2, Y_1) in 3, 3 and 5 isolines from Chiang Mai, Kanchanaburi and Phetchaburi provinces, respectively; Form B (X_1, X_3, Y_2) in 3 and 8 isolines from Chiang Mai and Ubon Ratchathani provinces, respectively; Form C (X_2, Y_3) in 1 isoline from Phetchaburi province. All 23 isolines exhibited an average branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging from 11.90-13.00 branches, which was in the limit of *An. barbirostris* (6-18 branches). Of the 12 human-biting isolines from Chiang Mai province, 5 isolines showed Form B (X_2, Y_2) and 7 isolines exhibited a new karyotypic form designated as Form E (X_2, Y_5). All of 12 isolines had an average branch summation of seta 2-VI pupal skins ranging from 22.40-24.50 branches, which was in the range of *An. campestris* (17-58 branches). Based on the similarity of X_2 chromosome between *An. barbirostris* and *An. campestris* in the current study, thus, they were tentatively designated as *An. campestris*-like Forms B and E, respectively.

DNA sequence analyses of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA and the cytochrome oxidase subunit I and II (COI and COII) genes of mitochondrial DNA from 18 and 7 isoline colonies of *An. barbirostris* and *An. campestris*-like strains from Chiang Mai, Phetchaburi, Kanchanaburi and Ubon

Ratchathani provinces revealed 3 distinct groups in *An. barbirostris*, which were designated as *An. barbirostris* group A1 (Chiang Mai, Ubon Ratchathani and Phetchaburi), A2 (Phetchaburi) and A3 (Kanchanaburi); and 1 unique group in *An. campestris*-like, *i.e.*, group CAM (Chiang Mai). The large sequence divergences of the ITS2, COI and COII genes among *An. barbirostris* group A1, A2 and A3, and *An. campestris*-like were 0.203-0.627, 0.026-0.056 and 0.030-0.051, respectively.

Crossing experiments among *An. barbirostris* group A1 (Form A, B and C), A2 (Form A) and A3 (Form A), and *An. campestris*-like Form B were performed. The results of post-mating reproductive isolation from all crosses by providing low rates of embryonic-developed eggs; few hatched and/or non-hatched eggs; low rates of larva, pupa and adult survival; asynaptic salivary gland polytene chromosome arms of F₁-hybrid larvae; and atrophy of the reproductive systems of F₁-hybrid females and males. Thus, molecular and crossing evidence strongly supported the existence of 4 sibling species members within the taxon *An. barbirostris*, provisionally designated as *An. barbirostris* species A1, A2 and A3, and *An. campestris*-like, respectively. The result of non post-mating reproductive isolation between the crosses of *An. campestris*-like Form B and E by yielding healthy F₁- and/or F₂-progeny indicated their conspecific relationship.

Comparative morphological investigations of egg, larva, pupa and adult under light microscope indicated that only the branch summation of seta 2-VI pupal skins could be used to separate *An. barbirostris* and *An. campestris*-like, whereas the surface topography of eggs among *An. barbirostris* species A1, A2 and A3, and *An. campestris*-like under scanning electron microscopy (SEM) were morphological similar.

Comparative salivary gland polytene chromosome examinations among *An. barbirostris* species A1, A2 and A3, and *An. campestris*-like revealed the homosequential banding pattern existed among 4 sibling species members.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาพันธุศาสตร์ของยุงก้นปล่องชนิด <i>Anopheles barbirostris</i>	
ผู้เขียน	นางสาวดิพร แซ่อึ้ง	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (ปรสตีวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. เวช ชูโชติ	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. อุดม ชัยทอง	กรรมการ
	รศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์	กรรมการ
	ศ. ดร. อัจฉริยา จิตต์ภักดี	กรรมการ
	ศ. ดร. เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์	กรรมการ
	ศ. ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของ ยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles barbirostris* ที่กัศกระบือ จำนวน 23 isolines พบว่ามีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 3 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (X_1, X_2, Y_1) จำนวน 3, 3 และ 5 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี และเพชรบุรี ตามลำดับ รูปแบบ B (X_1, X_3, Y_2) จำนวน 3 และ 8 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ และอุบลราชธานี ตามลำดับ และรูปแบบ C (X_2, Y_3) จำนวน 1 isoline จากจังหวัดเพชรบุรี จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่ของยุงทั้ง 23 isolines พบว่ามีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่เท่ากับ 11.90-13.00 แขนง ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. barbirostris* (6-18 แขนง) จากการวินิจฉัยรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ของ ยุงก้นปล่องชนิด *An. barbirostris* ที่กัศคนจำนวน 12 isolines พบว่ามีรูปแบบเมตาเฟสคาริโอไทป์ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบ B (X_2, Y_2) จำนวน 5 isolines และรูปแบบ E (X_2, Y_5) จำนวน 7 isolines ซึ่งรูปแบบ E นั้น เป็นรูปแบบใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนในประเทศไทย จากการนับผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่ของยุงทั้ง 12 isolines พบว่ามีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่เท่ากับ 22.40-24.50 แขนง ซึ่งอยู่ในช่วงของยุง *An. campestris* (17-58 แขนง) เนื่องจากยุงทั้ง 12 isolines มีค่าเฉลี่ยผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่เป็นยุง *An. campestris* แต่มีโครโมโซม X_2 ที่มีลักษณะเหมือนโครโมโซม X_2 ของยุง *An. barbirostris* ทุกรูปแบบ ดังนั้น จึงตั้งชื่อชั่วคราวเป็นยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS2 และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง COI และ COII ของยุง *An. barbirostris* จำนวน 18 isolines และยุง *An. campestris*-like จำนวน 7 isolines จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี กาญจนบุรี และอุบลราชธานี พบว่ายุง *An. barbirostris* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ยุง *An. barbirostris* กลุ่ม A1 (จังหวัดเชียงใหม่ อุบลราชธานี และเพชรบุรี) กลุ่ม A2 (จังหวัดเพชรบุรี) และกลุ่ม A3 (จังหวัดกาญจนบุรี) และยุง *An. campestris*-like มี 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม CAM (จังหวัดเชียงใหม่) โดยพบว่ายุงทั้ง 4 กลุ่มมีระยะห่างทางพันธุกรรมของยีนที่ตำแหน่ง ITS2, COI และ COII สูงเท่ากับ 0.203-0.627, 0.026-0.056 และ 0.030-0.051 ตามลำดับ

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามกลุ่มระหว่างยุง *An. barbirostris* กลุ่ม A1 (รูปแบบ A, B และ C) กลุ่ม A2 (รูปแบบ A) และกลุ่ม A3 (รูปแบบ A) และยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B ผลที่ได้จากการทดลองพบว่ายุงทั้ง 4 กลุ่มมีพันธุกรรมที่เข้ากันไม่ได้ โดยให้อัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนในไข่ต่ำ มีอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่ต่ำและ/หรือไม่มีการฟักตัวของตัวอ่อนออกจากไข่เลย ตัวอ่อน ตัวโม่ง และตัวเต็มวัยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ตัวอ่อนที่รอดชีวิตมีลักษณะแขนของโพลีทินโครโมโซมจากเซลล์ต่อมน้ำลายที่ไม่เข้าคู่กัน ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่ฝ่อ ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาทางอนุชีววิทยาและการผสมพันธุ์ข้ามกลุ่มจึงถือเป็นหลักฐานที่สำคัญที่สนับสนุนการค้นพบซิมพลีสปีชีส์ 4 สปีชีส์ในยุง *An. barbirostris* จึงตั้งชื่อชั่วคราวเป็นยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1, A2 และ A3 และยุง *An. campestris*-like ตามลำดับ จากการทดลองผสมพันธุ์ข้ามรูปแบบระหว่างยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E พบว่ามีพันธุกรรมที่เข้ากันได้ โดยให้ลูกรุ่น F₁ และ/หรือ F₂ ที่แข็งแรง ซึ่งผลจากการศึกษาได้สนับสนุนความสัมพันธ์ของยุง *An. campestris*-like รูปแบบ B และ E เป็นแบบ conspecific

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่ ตัวอ่อน ตัวโม่ง และตัวเต็มวัย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่ามีเพียงผลรวมของแขนงเส้นขน 2-VI ของคราบตัวโม่งเท่านั้นที่สามารถจำแนกยุง *An. barbirostris* และยุง *An. campestris*-like ออกจากกันได้ ในขณะที่การศึกษาลักษณะผิวของไข่ยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1, A2 และ A3 และยุง *An. campestris*-like ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

จากการศึกษาเปรียบเทียบแถบสีบนแขนของโพลีทินโครโมโซมที่ได้จากเซลล์ต่อมน้ำลายของยุง *An. barbirostris* สปีชีส์ A1, A2 และ A3 และยุง *An. campestris*-like ไม่พบความแตกต่างของการเรียงตัวของแถบสีบนแขนของโครโมโซมในยุงทั้ง 4 ซิมพลีสปีชีส์